

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

10/518317

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Dezember 2003 (24.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/106707 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68

(DE). KAPPLER, Matthias [DE/DE]; Lessingstr. 27,
06104 Halle (DE). WIRTH, Manfred [DE/DE]; Lud-
wig-Richter-Str. 11, 01326 Dresden (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/06306

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Juni 2003 (16.06.2003)

(74) Anwälte: RASCH, Dorit, R. usw.; GULDE HENGEL-
HAUPT ZIEBIG & SCHNEIDER, Schützenstrasse 15 - 17,
10117 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, CN, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
102 28 081.9 18. Juni 2002 (18.06.2002) DE

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): INVITEK GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH-
NIK & BIODESIGN MBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Str.
10, 13125 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MEYE, Axel [DE/DE]; Pohlandplatz 2, 01309
Dresden (DE). TAUBERT, Helge [DE/DE]; Wiese 14,
06348 Grosssörner (DE). HILLEBRAND, Timo [DE/DE];
Bogenstr. 29, 15366 Hönow (DE). BENDZKO, Peter
[DE/DE]; Ifflandstr. 32, 12623 Berlin (DE). KRÜGER,
Katharina [DE/DE]; Siegfriedstr. 202, 10365 Berlin

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING INCREASED SUSCEPTIBILITY TO TUMOURS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINER GESTEIGERTEN TUMORSUSZEPTIBILITÄT

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting increased susceptibility to tumours by specifically detecting a polymorphism in the position 354 A → G in the exon 12 of the human murine double minute-2 (MDM2) gene. Said polymorphism represents a hereditary marker for increased risk of cancer in humans. The invention also relates to the use of said tumour susceptibility marker for developing in vitro and in vivo test systems which integrate said markers, in a specific manner, into diagnostic, prognostic and possibly therapeutic methods.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität durch eine spezifische Detektion eines Polymorphismus an der Position 354 A → G im Exon 12 des humanen murine-double-minute-gene-2 (MDM2-Gen). Dieser Polymorphismus stellt einen hereditären Marker für ein erhöhtes Krebsrisiko beim Menschen dar. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung dieses Tumorsuszeptibilitätsmarkers zur Entwicklung von in vitro- und in-vivo Testsystemen, die in spezifischer Weise diesen Marker für diagnostische, prognostische und möglicherweise auch therapeutische Verfahren einbinden.



WO 03/106707 A1

Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität durch eine spezifische Detektion eines Polymorphismus an der Position 354 A → G im Exon 12 des humanen murine-double-minute-gene-2 (MDM2-Gen). Dieser Polymorphismus stellt einen hereditären Marker für ein erhöhtes Krebsrisiko beim Menschen dar. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung dieses Tumorsuszeptibilitätsmarkers zur Entwicklung von in vitro- und in-vivo Testsystemen, die in spezifischer Weise diesen Marker für diagnostische, prognostische und möglicherweise auch therapeutische Verfahren einbinden.

Das mdm2-Gen wurde erstmals in der spontan transformierten Mauszelllinie 3T3DM auf "double minute" Chromosomen identifiziert. Es ist bekannt, dass das Genprodukt MDM2 Mausfibroblasten transformieren und zu einem unkontrollierten und tumorauslösenden Wachstum führen kann. Das humane mdm2-Gen ist auf dem Chromosomenabschnitt 12q13-14 lokalisiert und gewann an Bedeutung als sich zeigte, dass es einen wichtigen Gegenspieler für das p53-Tumorsuppressorgen darstellt. Die gegenseitige Regulation erfolgt über einen "feed-back loop", d.h. das p53-Protein aktiviert die Transkription des mdm2-Gens und das gebildete MDM2-Protein kann wiederum den Abbau des P53-Proteins bewirken. Das MDM2-Protein besitzt eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität für P53, wodurch letzteres für den proteosomalen

30

Abbau markiert wird. Hierdurch wird eine sehr feine Regulation der Expression des P53-Proteins bewirkt, welche vor allem in der Embryogenese essentiell ist. So sind mdm-2 "knock-out"-Mäuse letal, aber überleben, wenn sie
5 zusätzlich auch kein funktionell aktives p53-Gen tragen. Es ist weiterhin bekannt, dass neben der Wechselwirkung mit dem p53-Tumorsuppressor MDM2 auch einen weiteren Tumorsuppressor-Stoffwechselweg beeinflusst, d.h. den von Rb-E2F-p16INK4A/p19ARF. So kann MDM2 an das RB-Protein
10 binden und den Rb-vermittelten G1-Zellzyklusarrest verhindern bzw. direkt mit den Transkriptionsfaktoren E2F1/DP wechselwirken und einen Übergang der Zellen in die S-Phase bewirken. Die negative Regulation von beiden Tumorsuppressorwegen, die in ca. 80 % aller Tumoren
15 betroffen sind, sowie zahlreiche Befunde, die belegen, dass das MDM2-Protein tumorgen wirkt, favorisieren das mdm2-Gen als ein Ziel für eine Gentherapie.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass spezifische
20 Bereiche von MDM2 mit zahlreichen Proteinen, wie P53, CBP/p300, pRB, p73, E2F1, DP1, dem L5 ribosomalen Ribonukleoprotein-Partikel, p14ARF und RNA wechselwirken können. Die spezifischen Funktionen von MDM2 in der Tumorgenese, dem Zellzyklus und der Apoptose werden in
25 exzellenten Übersichtsarbeiten diskutiert (Freedman et al., 1999, Momand et al., 2000, Juven-Gershon and Oren, 1999).

Die Rolle des mdm2 wurde insbesondere an Sarkomen untersucht, d.h. an bösartigen Tumoren mesenchymalen
30 Ursprungs. Sarkome weisen mit 20-30% die höchste Amplifikationsrate für das mdm2-Gen unter den malignen

Tumoren auf. Eine Überexpression von MDM2 in transgenen Mäusen resultiert in 38% der Fälle in einer Sarkomentwicklung (unabhängig vom p53-Status). Eine MDM2-Überexpression in Sarkom-Patienten korreliert signifikant mit einem schlechteren Überleben der betroffenen Patienten, was in einer multivariaten Coxregressions-Analyse gezeigt werden konnte (Würl et al. 1997).

Insgesamt weiß man noch relativ wenig darüber, welche normalen bzw. tumorspezifischen Stoffwechselwege durch die mdm2-mRNA bzw. das MDM2-Protein beeinflusst werden. Ein Weg, um die Funktion von Genen zu untersuchen, besteht in der Analyse der Auswirkung von Genalterationen. Das mdm2-Gen wurde bisher jedoch nur sehr wenig auf Genalterationen, d.h. Mutationen oder Polymorphismen untersucht. Es gibt nach intensiver Litearturrecherche insgesamt nur vier Publikationen zu diesem Themenkomplex. Dies sind ein Negativbefund (keine Genalterationsfunde) in humanen Primärtumoren (Silva et al. 2000), selten auftretende Punkt- und Insertionsmutationen im Zinkfingerbereich des MDM2 (Schlott et al. 1997), ein Polymorphismus im 5' untranslatierten Bereich (Heighway et al. 1994) und ein weiterer Polymorphismus im Exon 10 im Zinkfingerbereich (Taubert et al. 2000). Dieser Polymorphismus wurde ausschließlich für Weichteilsarkome (im Vergleich zur polymorphen Alleliehäufigkeit bei gesunden Kontrollprobanden) ermittelt. Der Polymorphismus war mit einem Trend zu einem kürzeren Überleben (38 Monate gegenüber 57 Monate bei Patienten ohne Polymorphismus) verbunden.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, tumor-assoziierte Mutationen bzw. Polymorphismen des menschlichen mdm2-Gens zu ermitteln und ihre Korrelationen mit Krankheitsprädispositionen festzustellen. Ausgehend von diesen Korrelationen soll ein Verfahren zur molekulargenetischen Diagnostik dieser Krankheitsprädispositionen entwickelt werden. Ziel ist die Etablierung eines Modells, in dessen Folge eine prophylaktische oder palliative Therapie durchführbar wird, die sowohl chirurgischen als auch medikamentösen Charakter tragen kann.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass der in Codon 354 des Exons 12 des MDM2 Gens (Nucleotid 1373 der Sequenz NM_002392) auftretende Polymorphismus A → G (GAA → GAG) nicht auf Weichteilsarkome beschränkt ist, sondern mit der Prädisposition von verschiedenen malignen Tumorarten korreliert und überraschend hereditärer Natur ist, d.h. bereits in der Keimbahn konserviert vorliegt.

Es wurde gefunden, dass dieser Polymorphismus bevorzugt in bestimmten soliden Tumoren epithelialen Ursprungs (Prostatakarzinom-Entität) korreliert, aber nicht auf diese beschränkt ist, sondern auch für die Suszeptibilität weiterer solider und hämatologischer Tumore eine wesentliche Bedeutung besitzt.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zum Nachweis einer Tumorsuszeptibilität, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Nukleinsäure eines Probanden

isoliert und die Sequenz des menschlichen mdm2-Gens anhand des Basenaustausches $A \rightarrow G$ (GAA \rightarrow GAG) an der Position 354 des Exons 12 genotypisiert wird, wobei eine hochspezifische und sehr sensitive Bestimmung des Alleliestatus dieses polymorphen Genortes (Unterscheidung von Homo- und Heterozygotie) bevorzugt im Hochdurchsatzverfahren erfolgt.

Die Genotypisierung erfolgt durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind. Dazu gehören PCR-gestützte Genotypisierungsverfahren, wie z.B. allelspezifische PCR, andere Genotypisierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden [Beispiele sind „dot blotting“ oder Oligonucleotide Ligation Assays“ (OLA)], Verfahren unter Verwendung von Restriktionsenzymen und „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) Analyse mittels „Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry“ (MALDI) sowie prinzipiell jede zur Verfügung stehende Methode zur Variantendetektion einschließlich der Chiptechnologie in all ihren technologischen Ausführungen.

Ausgehend davon ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung eines breiten Spektrums verschiedenster Prädispositionen geeignet. In einer Ausführungsvariante der Erfindung dient das Verfahren für den Nachweis des homozygoten oder heterozygoten Polymorphismus $A \rightarrow G$ an Position 354 (Exon 12) als hinreichendes Kriterium für die genetische Prädisposition für eine potentielle Tumorsuszeptibilität, insbesondere als hinreichendes Kriterium für die genetische Prädisposition für ein

potentielles Tumorrisiko des betroffenen Probanden und für seine Nachkommen.

In einer bevorzugten Variante ist das Verfahren anhand des
5 Nachweises des homozygoten oder heterozygoten Polymorphismus als hinreichendes Kriterium einer potentiellen Tumorsuszeptibilität für solide epitheliale Tumoren, wie z.B. Prostatakarzinom (PCa), Mammakarzinom, Zervixkarzinom und/oder Ovarialkarzinom anzuwenden.
10 Besonders bevorzugt ist das Verfahren für den Nachweis einer Tumorsuszeptibilität von PCa geeignet.

Es wird dem molekularbiologisch-spezialisierten Diagnostiker ein universeller hereditärer Tumormarker in
15 die Hand gegeben.

Entsprechend der Erfindung besteht in Abhängigkeit des homozygoten oder heterozygoten Nachweises bestimmter Haplotypen die Möglichkeit, eine differenzierte Aussage zur
20 genetischen Prädisposition zu treffen. Dadurch wird eine molekulargenetisch fundierte genetische Beratung ermöglicht.

Weiterhin stellt das Auffinden dieses Polymorphismus ggf.
die diagnostische Grundlage für präventive Maßnahmen dar.

25 Der Nachweis erfolgt anhand isolierter Nukleinsäuren, wobei sowohl DNA als auch RNA verwendet werden kann. Isolierte RNA wird mit dem Fachmann bekannten Methoden in mRNA und cDNA umgeschrieben. Anschließend wird die DNA sequenziert.

Aufbauend auf dieser Erkenntnis können unter Verwendung dieser variablen (mutierten) Nukelotid-DNA-Sequenz erfindungsgemäß neue Klassen von Therapeutika entwickelt werden, die auf Gene gerichtet sind, die die Pathways des mdm2-Gens beeinflussen, und das mdm2-Gen (oder damit zusammenhängender Gene) angreifen und via Regulation der Transkription und Translation sowie zur Beeinflussung von deren Effizienz, vorzugsweise durch Regulation der Expression, wirken.

10

Die Pathways des mdm2-Gens beeinflussende Gene sind z.T. bekannt. Dazu gehören zum Beispiel:

- p53 - p14
- Rb-p16INK4A/p19ARF-E2F
- mdm-1.

15

Bevorzugt führt dies zur Entwicklung von Therapeutika, die auf das humane mdm2-Gen gerichtet sind und dieses an der Position 354 A → G Exon 12 im MDM2-Gen angreifen.

20

Desweiteren sind Gegenstand der Erfindung in vitro- und in vivo-Testsysteme. Diese Testsysteme exprimieren die an der Position 354 A → G Exon 12 mutierte Sequenz des menschlichen mdm2-Gens, und können zur Untersuchung von Erkrankungen mit Beteiligung des mdm2-Gens dienen, sowie zur Entwicklung und Testung individuell spezifischer Therapeutika im allgemeinen.

25

Solche Testsysteme sind dem Fachmann bekannt und können Zelllinien, Xenotransplantat- und andere Tiermodelle usw. sein.

30

Im folgenden wird die Erfindung am Beispiel des Nachweises einer Tumorsuszeptibilität von Prostatakarzinomen (PCa) näher erläutert, ohne dass sie darauf beschränkt werden soll.

Bei der Durchführung der Analysen ausgewählter und präoperativ gewonnener Blut-DNA-Proben von Patienten mit urologischen Tumor-Proben wurde bei Patienten mit diagnostiziertem primären PCa mit entsprechender Familienanamnese (keine Hinweise auf familiäre PCa-Fälle) und entsprechender Therapie (überwiegend lokal begrenzte PCa, die mittels radiaker Prostatektomie unter kurativem Behandlungsziel entfernt worden sind; seltener Fälle von mittels Chemotherapie behandelten hormonrefraktären PCa) ein gegenüber der Normalbevölkerung der Bundesrepublik Deutschland erhöhter Heterozygotiegrad für den mdm2-SNP A → G an der Position 354 (Exon 12) detektiert.

In sukzessiv erweiterten Analysen konnten bisher in 31 von 229 untersuchten DNA-Proben (13,5%) der Polymorphismus eindeutig nachgewiesen werden. Aus diesem Untersuchungsgut kann eindeutig geschlossen werden, dass die mdm2-Polymorphismusrate gegenüber der Normalbevölkerung mehr als verdoppelt ist (unter der Annahme, dass sich unter den Kontrollprobanden, die zur Bestimmung des Heterozygotiegrades in der gesunden und jungen Normalbevölkerung herangezogen worden waren, auch männliche Probanden mit einem nicht prädiktiv definierbaren PCa-Risiko befinden). Dieses Ergebnis bedeutet, dass der heterozygote Genlocus ein potentieller

Tumorsuszeptilitätsfaktor für Patienten mit sporadischem PCa darstellt.

Interessant war weiterhin die Beobachtung, dass in zwei
5 DNA-Proben von Patienten mit fortgeschrittenen PCa
homozygote Allelieresultate (beide Allele entsprachen dem
Polymorphismus A → G an der Position 354 (Exon 12)
auftraten.

10 Es konnten bestehende Probleme in der HTS-Anwendung für ein
molekulares Screening zum Nachweis des
individualspezifischen Allelstatus am zu untersuchenden
mdm2-Genlocus gelöst werden. Die Bestimmung des zu
untersuchenden mdm-2 Polymorphismus wurde mit hoher
15 Sensitivität und bei exakter Typisierung von vorliegender
Homo bzw.-Heterozygotie in Patienten-DNA parallel
durchgeführt. Die gewählte Methodik ist einfach und schnell
in der Durchführung und zeichnet sich durch einen hohen
Grad an Reproduzierbarkeit und Robustheit aus.

20

Das Verfahren kann darüber hinaus hochintegrativ an eine
vollautomatische DNA Extraktion aus kernhaltigen Blutzellen
gekoppelt werden und ist potentiell ebenfalls separat oder
in Kombination mit der molekularen Probenvorbereitung
25 vollständig automatisierbar. Das bevorzugte
Nachweisverfahren basiert auf einem DNA-ELISA und
nachfolgender indirekt enzymatischen Detektion des
Hybridisierungsergebnisses im 96-well Format. Diese
bevorzugte Ausführungsvariante eines DNA-ELISAs soll
30 weitere Verfahrensmöglichkeiten zum molekularen Screenings
des zu untersuchenden mdm2-Locus allerdings nicht

einschränken. In der bevorzugten Ausführungsvariante (DNA-ELISA) wurden aus der zuvor isolierten genomischen DNA aus den zu untersuchenden Patienten-Blutproben mittels PCR-Technologie doppelsträngige DNA-Fragmente generiert, welche den zu untersuchenden mdm2-Genlocus flankieren. Das für die PCR Verwendung findende Primerpaar enthielt dabei einen Primer welcher an seiner 5'-Position biotinyliert war. Das generierte PCR-Fragment ist damit nach Amplifikation ebenfalls biotinyliert. Das PCR-Fragment wird nachfolgend an die Oberfläche einer Streptavidin beschichteten 96-Well Mikrotestplatte überführt und über die Biotinylierung an der Plattenoberfläche kovalent gebunden. Das an der Plattenoberfläche gebundene doppelsträngige DNA-Fragment wird nach Zugabe einer NaOH-Lösung denaturiert und der nichtgebundene DNA-Einzelstrang mittels eines kurzen Waschschrilles entfernt. Der kovalent gebundenen DNA-Einzelstrang dient nachfolgend als Zielsequenz für eine basenkomplementäre Hybridisierungsreaktion zur Genotypisierung des mdm2 Status. Hybridisiert wird nachfolgend jeweils mit zwei FITC-markierten Oligonukleotidsonden/Probenamplifikat, welche basenkomplementär zu den beiden potenziell möglichen mdm2-Allelvarianten am zu untersuchenden mdm2-Locus sind. Der Nachweis der Hybridisierungsreaktion erfolgt indirekt enzymatisch über eine enzymkonjugierte Anti-FITC-Antikörperreaktion mit anschließendem Substratumsatz. Der Nachweis des vorliegenden Allelstatus erfolgt über die Auswertung der nach Ablauf der Reaktion entstandenen Farbumschläge bzw. deren Intensitäten in den jeweiligen Wells. Anhand der Farbmuster kann eindeutig über das Vorliegen von homozygoten bzw. heterozygoten Merkmalsträgern entschieden

werden. Das Verfahren gestattet es, mit einer 96-Well-
Platte 48 Patienten-DNAs simultan zu untersuchen. Die
Reproduzierbarkeit und die Robustheit des Verfahrens wurden
im Rahmen der untersuchten großen Probenumfänge
5 einschließlich durchgeführter Blindserien bewiesen. Mittels
zusätzlicher DNA Sequenzierung wurden die im DNA-ELISA
generierten Ergebnisse bei einer Reihe der Proben eindeutig
verifiziert.

10 Das Testergebnis wurde für alle auffälligen Proben und
einer repräsentativen Probenzahl unauffälliger Proben
reevaluiert und 100%ig durch ein anderes anerkanntes
Nachweissystem (direkte PCR-DNA-Sequenzierung, ALF Express,
PharmaciaBiotech) unabhängig bestätigt.

15 Darüber hinaus wurden in weiteren Blindexperimenten
multiple DNA-Aliquots gleicher Probanden sowie
Negativkontrollen in abhängigen und unabhängigen
Versuchsserien bestimmt. Auch diese Untersuchungen ergaben
20 vollständig übereinstimmende qualitative Ergebnisse, was
die Sensitivität des gewählten Nachweisverfahrens belegt.
Momentan laufen weiterführende Studien, mit denen
endgültige statistische Auswertungen für mehr als 400
Patienten mit nachweisbarem sporadischen PCa erfolgen.

25 Laufende Untersuchungen zu anderen Karzinomtypen belegten
die Assoziation des Auftretens dieses Genpolymorphismus mit
einer gehäuften Tumorrates für weitere solide epitheliale
Tumorentitäten. So wurde z.B. in 5 von bisher 32
30 untersuchten Blut-DNA-Proben (15,6%) von Patienten mit
Mamma, Zervix- oder Ovarialkarzinomen, ein heterozygoter

mdm2-Alleliestatus nachgewiesen.

Zum Nachweis der Spezifität der beschriebenen PCR-ELISA-Analyseresultate wurde eine Probanden-Subpopulation mit
5 bekanntem Alleliestatus zum polymorphen mdm2-Genort reevaluiert. Zusätzlich wurde versucht, durch eine Vergrößerung der Kontrollgruppe die genaue Heterozygotiefrequenz in der Normalbevölkerung (alle in dieser Arbeit beschriebenen DNA-Proben stammen von gesunden Kontroll-
10 probanden bzw. Tumorpatienten aus dem Einzugsgebiet Sachsen und Sachsen-Anhalts aus den Jahren 1996-2001 und wurden mit schriftlicher Einwilligung der Patienten gewonnen und nach der DNA-Präparation anonymisiert archiviert) definieren zu können. Die dafür eingesetzten DNA-Proben stammen
15 ausschliesslich von Blutspendern mit entsprechend harten Einschlusskriterien für die entsprechenden Blutspenden (kein Nachweis einer Tumorerkrankung zum Spendetermin bzw. davor, keine bekannten familiären Erkrankungen, keine erhöhte natürliche Exposition gegenüber Bestrahlung und
20 anderen mutagenen/kanzerogenen Stoffen im beruflichen bzw. privaten Bereich).

Von 108 Blut-DNA-Proben normaler Probanden, die anteilig bereits von Taubert et al. (2000) mittels Sequenzierung und
25 Restriktionsverdau unabhängig auf den mdm2-Polymorphismus untersucht worden waren, konnten alle damals detektierten heterozygoten DNA-Proben mittels PCR-ELISA eindeutig verifiziert werden. Weiterhin konnten die Polymorphismen-Befunde von 31 DNA-Proben von WTS-Gewebe aus dieser
30 Vorstudie mit einer 100%igen Spezifität bestätigt werden. Darüber hinaus wurden von einigen dieser WTS-Patienten

(n=6), deren Tumorgewebe-DNA den mdm2-Polymorphismus aufwies, korrespondierende DNA-Blutproben analysiert, die wiederum alle positiv in der Detektion waren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die an WTS-Patienten-Gewebe-
5 DNA-Proben detektierten Polymorphismen mit hoher Wahrscheinlichkeit alle hereditärer Natur sind, d.h. der Polymorphismus ist in der Keimbahn konserviert.

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die zweithäufigste
10 Krebserkrankung des Mannes in Mitteleuropa und hat aufgrund seiner steigenden Inzidenz in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. In den USA stellt sie mittlerweile die am häufigsten diagnostizierte Tumorart dar und repräsentiert nach dem Lungenkarzinom die Tumorentität mit
15 der höchsten Tumor-bedingten Sterberate. Die Krankheit wird in 80% der Fälle bei Männern über 65 Jahren diagnostiziert. Während das lokal begrenzte PCa durch die Entfernung der Prostata heilbar ist, kann bei lokal fortgeschrittenen und metastasierenden Tumoren nicht mehr von einer kurativen
20 Behandlung ausgegangen werden. Die 3-Jahres-Überlebensraten liegen beim metastasierten Tumor nur bei 40%. Die Metastasierung erfolgt beim PCa über die Blut- oder Lymphbahnen. Die primären Ansiedlungsorte der lymphogenen Metastasierung sind die pelvinen Lymphknoten. Hämatogene
25 Mikrometastasen betreffen vornehmlich das Skelettsystem und hier vor allem Becken und Wirbelsäule, aber auch einzelne Organe, wie die Leber und die Lunge. Beim metastasierten PCa zielen operative und medikamentöse Therapien auf die Unterdrückung der Bildung bzw. der Wirkung des Hormons
30 Testosteron, welches maßgeblich die Proliferation der Prostata- und PCa-Zellen fördert. Die korrekte Bestimmung

des Tumorstadiums, d.h. ob es sich noch um ein lokal begrenztes oder bereits metastasiertes PCa handelt, ist daher ganz entscheidend für die nachfolgende Therapieform. Die derzeitigen Untersuchungsmethoden, die bei der

5 Primärdiagnostik des PCa angewendet werden, sind die digitale rektale Untersuchung, die Bestimmung des Tumormarkers PSA (prostataspezifisches Antigen) im Serum und bei einer Entnahme von Biopsiematerial, deren histopathologische Begutachtung sowie im Einzelfall die

10 diagnostisch pelvine Lymphadenektomie und ggf. MRT und CT sowie Knochenszintigrafie. Eine beginnende Metastasierung (disseminierte PCa-Zellen im Blut, geringer Befall von regionären Lymphknoten) kann bis zum heutigen Zeitpunkt diagnostisch im Blut nicht bzw. im Falle der Lymphknoten

15 ausschließlich postoperativ durch eine histopathologische Untersuchung nachgewiesen werden. Die zum präoperativen Nachweis zur Verfügung stehenden bildtechnischen Verfahren (CT, MRT) haben eine geringe Sensitivität, die zwischen 22-26% liegt und erlauben nur die Darstellung von ausgedehnten

20 Metastasen. Da die Metastasierung in einer deutlichen Abhängigkeit zum Tumorstadium, Tumolvolumen und Tumorgrad steht, sind dies neben der histologischen Differenzierung (Gleason Score) die wichtigsten Faktoren, die derzeit für eine Prognose der Patienten herangezogen werden.

25

Die Bestimmung des Tumormarkers PSA (prostataspezifisches Antigen) ist neben der digitalen rektalen Untersuchung eine sehr selektive und sensitive Standardmethode zur Früherkennung eines PCa. Das prostataspezifische Antigen

30 ist jedoch kein karzinomspezifischer, sondern ein gewebespezifischer Marker der Prostata. Erhöhte PSA-

Serumwerte deuten auf das Vorhandensein eines PCa hin. Die Differenzierung zwischen BPH und Karzinom mit Hilfe des PSA-Wertes fällt besonders im Bereich zwischen 2-10 ng/ml schwer, da die BPH mit steigendem Alter häufiger auftritt und der PSA-Wert aufgrund des natürlichen Prostatawachstums mit zunehmendem Alter ansteigt. Die Expression von PSA wird durch die Hormone Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) reguliert. Bei einer hormonellen Behandlung von Patienten (Hemmung der Wirkung von Testosteron, Dihydrotestosteron), kommt es zu einem Abfall des PSA-Wertes im Serum.

Aufgrund der gesundheitspolitischen Bedeutung des PCa (insbesondere in den westlichen Industrieländern), dem Fehlen tumorspezifischer Marker sowie der bekannten tumorbiologischen und zellulären Heterogenität des Tumors gibt es eine intensive Suche auf dem Gebiet der klinischen Forschung zum PCa, die u.a. auf die Identifizierung weiterer genetischer und epigenetischer Kofaktoren für das sporadische und hereditäre PCa fokussiert ist. Insbesondere in den USA gibt es gut charakterisierte Familien mit einer erhöhten PCA-Inzidenz, die weitreichende humangenetische Studien zum (familiären) PCa erlauben.

Die vorliegende Erfindung offenbart einen universellen hereditären Tumormarker mit dem Polymorphismus A → G (GAA → GAG) an der Position 354 des Exons 12 des mdm2-Gens insbesondere für PCa. Es wurde gezeigt, dass der Polymorphismus eine strenge Assoziation zum PCa zeigt. Mit der Detektion dieses Polymorphismus kann eine Erhöhung der Aussage hinsichtlich einer genetischen Prädisposition für

Pca und möglicher assoziierter Krankheitsbilder erzielt werden.

Referenzen:

5

- Freedman DA, Wu L, Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. Cell Mol Life Sci 55: 96-107.
- Juven-Gershon T, Oren M (1999) Mdm2: the ups and downs. Mol Med 5: 71-83.
- 10 • Momand J, Wu HH, Dasgupta G (2000) MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. Gene 242: 15-29.
- Würfl P, Meye A, Berger D, Bache M, Lautenschläger C, Schmidt H (1997) Prognostic relevance of C-terminal MDM2
15 detection is enhanced by positivity in soft tissue sarcomas. Diagn Mol Pathol 6: 249-54.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Tumorsuszeptibilität,
dadurch gekennzeichnet, dass
5 eine Nukleinsäure eines Probanden isoliert und die
Sequenz des menschlichen mdm2-Gens anhand des
Basenaustausches A → G (GAA → GAG) an der Position
354 des Exons 12 genotypisiert wird, wobei eine
Bestimmung des Allelie-status dieses polymorphen
10 Genortes erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Nachweis des homozygoten oder heterozygoten
15 Polymorphismus (Mutation) als hinreichendes Kriterium
für die genetische Prädisposition für eine potentielle
Tumorsuszeptibilität verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
20 der Nachweis des homozygoten oder heterozygoten
Polymorphismus (Mutation) als hinreichendes Kriterium
für die genetische Prädisposition für ein potentielles
Tumorrisiko für den Probanden und für seine Nachkommen
verwendet wird.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Nachweis der homozygoten oder heterozygoten
Mutation als hinreichendes Kriterium einer
30 potentiellen Tumorsuszeptibilität für

Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Zervixkarzinom und/oder Ovarialkarzinom verwendet wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
5 dadurch gekennzeichnet, dass
die Genotypisierung durch Sequenzierung der DNA oder
durch andere Methoden, die zur Detektion von
Punktmutationen geeignet sind, erfolgt.
- 10 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Genotypisierung durch DNA-ELISA unter Verwendung
multipler, hochspezifischer Amplifikationsprimer und
markierter Hybridisationssonden erfolgt.
- 15 7. Therapeutika, die auf Gene gerichtet sind, die die
Pathways bezüglich des mdm2-Gens beeinflussen und/oder
den Polymorphismus A → G (GAA → GAG) an der Position
354 des Exons 12 des mdm2-Gen oder damit
20 zusammenhängender Gene angreifen und via Regulation
der Transkription und Translation sowie zur
Beeinflussung von deren Effizienz, vorzugsweise durch
Regulation der Expression, wirken.
- 25 8. Therapeutika, die auf das humane mdm2-Gen gerichtet
sind und die die ausgetauschte Position A → G (GAA →
GAG) an der Position 354 im Exon 12 des mdm2-Gens
angreifen und via Regulation der Transkription und
Translation sowie zur Beeinflussung von deren
30 Effizienz, vorzugsweise durch Regulation der
Expression, wirken.

9. In vitro- und in vivo-Testsysteme, die die Form des menschlichen mdm2-Gens exprimieren, welche die Mutation (den Polymorphismus) A → G (GAA → GAG) an der Position 354 des Exons 12 des mdm2-Gens aufweist, wobei die Testsysteme zur Untersuchung von Erkrankungen mit Beteiligung des mdm2-Gens dienen, sowie zur Entwicklung und Testung individuell spezifischer Therapeutika im allgemeinen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/06306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAUBERT H ET AL: "A mboII polymorphism in exon 11 of human MDM2 gene occurring in normal blood donors and in soft tissue sarcoma patients: an indication for an increased cancer susceptibility" MUTATION RESEARCH, vol. 456, 2000, pages 39-44, XP002258100 cited in the application the whole document	1
A	SCHLOTT T ET AL: "Point mutations and nucleotide insertion in the MDM2 zinc finger structure of human tumours" JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 182, no. 1, 1997, pages 54-61, XP008023396 cited in the application the whole document	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C:

☐ Patent family members are listed in annex:

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2003

Date of mailing of the international search report

03/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/06306

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 7, 8, ...
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION SHEET PCT/ISA 210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of I.2

Claims: 7, 8

The current Claims 7 and 8 relate to therapeutic agents defined by a desirable characteristic or property, namely that they affect the pathways pertaining to the mdm2 gene.

The claims therefore encompass all products, etc., that have this characteristic or property, but the application provides no support by the description (PCT Article 5) for products, etc. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product, method, compound or apparatus in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen.

PCT/EP 03/06306

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TAUBERT H ET AL: "A mboII polymorphism in exon 11 of human MDM2 gene occurring in normal blood donors and in soft tissue sarcoma patients: an indication for an increased cancer susceptibility" MUTATION RESEARCH, Bd. 456, 2000, Seiten 39-44, XP002258100 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1
A	SCHLOTT T ET AL: "Point mutations and nucleotide insertion in the MDM2 zinc finger structure of human tumours" JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 182, Nr. 1, 1997, Seiten 54-61, XP008023396 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/06306

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 7, 8
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 7,8

Die geltenden Patentansprüche 7,8 beziehen sich auf Therapeutika, die durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft „gecharakterisiert“ sind, nämlich, dass sie die Pathways bezüglich des mdm2-Gens beeinflussen.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, obwohl die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keine Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt/Verfahren/die Verbindung/Vorrichtung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.